

**Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
an Androspermien unter Berücksichtigung von
Karenzzeiten und Färbedauer**

Nikolaus Henkel

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551923_0062

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität München
Direktor: Prof. Dr.med. Wolfgang S P A N N

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an AndrospERMien
unter Berücksichtigung von Karenzzeiten und Färbedauer

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
NIKOLAUS HENKEL

aus
München
im Jahre

1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. Liebhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Spann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.6.1975



Meinen Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1 - 3
B. Material und Methodik	4 - 6
1. Patientengut	4
2. Technik der Fluoreszenzfärbung	5
3. Beurteilung der angefärbten Präparate ...	6
C. Ergebnisse	7 - 18
D. Diskussion	19 - 22
E. Zusammenfassung	23
F. Literaturverzeichnis	24 - 26

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Durch die Einführung der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Metaphasenchromosomen mittels Akridinderivaten wurden der genetischen Forschung neue Wege eröffnet.

Caspersson, Zech und Johansson (1970) führten als erste die Methode der Fluorochromierung von Zellen mit Quinacrinderivaten ein. Damit gelang die eindeutige Darstellung des Y-Chromatins sowohl im Interphasenkern als auch in der Metaphase.

1970 ermöglichten Barlow und Vosa eine Trennung von X- und Y-tragenden Spermatozoen. Sie verwendeten dabei Quinacrin-Dihydrochlorid und Quinacrine-Mustard.

Das Y-Chromosom von Körperzellen konnte in der Interphase während der Meiose erstmals von Pearson und Bobrow (1970) nachgewiesen werden.

Damit war der Ausgangspunkt zu einer Identifizierung sogenannter Andro- und Gynospermien geschaffen. Es folgten eine Reihe weiterer fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen verschiedener Autoren über das Verhältnis zwischen Y-Chromatin positiven und negativen Spermien im Ejakulat.

Auf Grund der meiotischen Reduktionsteilung während der Spermiogenese wären eigentlich 50 % Y-Chromatin positiver Spermien zu erwarten. Ein solcher Wert wird aber nur selten beobachtet. (Pawlowitzki et al. 1971, Sumner et al. 1971, Moscetti et al 1971 und 1972, Majewski et al. 1971, Kim, A. 1971, Rohde et al. 1972, Kaiser et al. 1974, Kegel et al. 1972).

Die Technik der Fluorochromierung menschlicher Chromosomen variierte zwar z.B. durch Trypsinbehandlung (Rohde) oder durch Verwendung von Atebrin (Kim), grundsätzlich werden jedoch heute Acridinderivate zur selektiven Darstellung des Y-Chromosoms verwendet.

Die Untersuchungen Casperssens (1972) haben gezeigt, daß sich besonders Quinacrine-Mustard in bestimmten Teilen der Chromosomen anreichern. Sie lassen im UV-Licht ein Bandenspektrum erkennen, das für jedes Chromosom spezifisch ist. Innerhalb des menschlichen Karyotyps hebt sich das Y-Chromosom durch seine intensive Fluoreszenz des distalen Abschnitts des langen Arms von allen anderen Chromosomen ab. Auch im Interphasenkern ist dieses Phänomen sichtbar, so daß damit eine einfache Methode für die Bestimmung der in der Zelle enthaltenen Y-Chromosomen gewonnen ist.

Nach dem seit 2 Jahrzehnten geübten Nachweis des XX-Chromosomenpaares als sogenanntes "Sexchromatin", auch "Barrsches Körperchen" genannt, ist es nun möglich, das Y-Chromosom auch im Ruhekern nachzuweisen und zur Bestimmung des genetischen Geschlechts heranzuziehen.

Die von Caspersson entwickelte Methode beruht auf der Bindung fluoreszierender Substanzen an den basischen Anteil der DNS. Caspersson vermutet außerdem eine Bindung der alkylierenden Gruppe an das Atom N 7 des Cyanins.

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob unterschiedliche Karenzzeit beziehungsweise Methodik das Verhältnis zwischen Y-Chromatin-positiven und -negativen Spermien beeinflusst.

B. MATERIAL UND METHODIK

Untersucht wurden frisch entnommene Ejakulate von 60 Spendern, die sich in folgende Gruppen einteilen lassen:

1. Patienten mit Fertilitätsstörungen, von denen in der Andrologischen Abteilung der Dermatologischen Universitätsklinik München Spermiogramme angelegt wurden. Die Karenzzeit betrug bei ihnen 5 Tage, Patienten mit Oligospermie schieden aus. In dieser Gruppe befinden sich insgesamt 30 Patienten, es wurden in 3 Versuchen jeweils 10 Ejakulate untersucht. Beim 3. Versuch wurde eine verschiedene Färbezeit von 15 bzw. 30 Min. berücksichtigt.
2. Unausgewählte Spender im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Die Karenzzeit betrug bei ihnen maximal 1 - 2 Tage. In dieser Gruppe befinden sich ebenfalls 30 Kontrollpersonen, es wurden zuerst 20 Ejakulate, im 2. Versuch nochmals 10 untersucht. Schließlich wurden 5 Ejakulate nach verschiedener Färbezeit (15 bzw. 30 Min.) untersucht.
3. 5 unausgewählte Probanden, von denen auf Löschpapier Spuren von Androspermien gelegt wurden.

Dieses Material wurde in bestimmten Abständen, insgesamt 2 Monate, auf den Gehalt an Y-tragenden Spermien untersucht, mit dem Ziel, eine Abnahme der Fluoreszenz festzustellen.

Bei der Untersuchung des Materials wurde folgende Methode angewandt:

Die Ejakulate wurden auf Objektträgern ausgestrichen, 10 Min. luftgetrocknet und 5 Min. in 25 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurden sie getrocknet und 15 bzw. 30 Minuten in 0,01 % Quinacrin-Mustard-Lösung gefärbt. Nachdem sie 6 Minuten in frischem Wasser gestanden hatten, wurden sie mit Phosphatpuffer (pH 5,5) eingedeckt und unmittelbar danach im Fluoreszenzmikroskop geprüft. Bei dem Anlegen von Spuren wurde Filterpapier mit dem gewonnenen Ejakulat durchtränkt. Das Papier wurde in einem geschlossenen Raum bei Zimmertemperatur gelagert. Bei der Auszählung wurde jedesmal ein Stückchen mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt und auf dem Objektträger zerkleinert. Der auf diese Weise entstandene Ausstrich wurde ebenso wie oben angefärbt. Die Färbezeit betrug 15 Minuten. Bei jedem Präparat wurden 100 Zellen ausgezählt.

Die Beurteilung erfolgte mit einem Ölimmersionsobjektiv (Apochromat 170/0, 17. Oel 100/1,30) bei einer 1000 Vergrößerung im Leitz Ortholux-2-Mikroskop. Als Lichtquellen wurde eine Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 50 Watt unter Benutzung eines K 530 Filters verwandt.

Beurteilung der angefärbten Präparate

Das gesamte Spermium stellte sich in der typischen gelbgrünen Fluoreszenz dar. Die Spermien zeigten sich als gut erkennbare, ovale Zellen, der Schwanzteil war meistens zu erkennen, sowie eine Abgrenzung von Kopf und Rumpf. Der Spermienkopf stellte sich in besonders intensiver Fluoreszenz dar, die sich meist deutlich von einer am Rande der Zelle liegenden Zone absetzt, die entsprechend dunkler erscheint. In dieser Region vermutet man die Galea capitis. Das Sexfluorogen zeigte sich in jedem Falle in einem hell leuchtenden Bereich im Kopfteil der Zellen. Es war jedoch nur selten in der Mitte gelegen, meist am Rande des Spermienkerns.

Das auffällig fluoreszierende Feld stellt den Bereich des Chromatins dar, eine genaue Lokalisation konnte jedoch nie festgestellt werden, da man sowohl ovale Kopfformen als auch spitzköpfige Spermien ohne Chromatینگrenze sah. Ein stark fluoreszierender, meist in der Nähe des Chromatins gelegener Punkt war das entscheidende Merkmal, nach dem man zwischen Andro- bzw. Gynäkospermium unterschied.

Nach Barlow und Vosa (1970) ist dies der Teil des Chromatins, in dem das distale Segment des langen Armes des Y-Chromosoms liegt.

C. ERGEBNISSE

Tabelle I zeigt eine Zusammenstellung sämtlicher untersuchter Ejakulate, links Personen mit einer Woche Karenzzeit, rechts ohne Karenzzeit. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an Y-tragenden Spermien an, der für jedes untersuchte Präparat einmal ausgezählt wurde. Die Färbezeit beträgt bei allen Präparaten 15 Minuten:

<u>Tabelle I:</u>	Präp. Nr.	mit Karenz (%)	ohne Karenz (%)
	1	6	10
	2	6	12
	3	8	14
	4	10	16
	5	12	22
	6	16	30
	7	21	33
	8	27	34
	9	30	34
	10	30	35
	11	31	38
	12	31	39
	13	33	40
	14	33	40
	15	35	42
	16	36	43
	17	36	44
	18	39	45
	19	42	46
	20	44	52
	21	45	54
	22	48	55
	23	51	55
	24	52	55
	25	53	56
	26	55	58
	27	56	58
	28	59	58
	29	61	61
	30	64	62

Stichproben Mittelwerte: $\bar{x}_1 = 35,667$ (Personen mit Karenz)

$\bar{x}_2 = 41,367$ (Personen ohne Karenz)

Stichproben-
varianzen : $s_1^2 = 291,398$ $s_2^2 = 209,293$

Stichprobenstreuung = Standardabweichung :

$$s_1 = 17,070 \quad s_2 = 14,467$$

$$s_{1,2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_1)^2}{n-1}}$$

Um zu prüfen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Meßreihen vorliegt, wird der t-Test durchgeführt. Da die Stichprobenumfänge $n_1, n_2 = 30$ kleiner sind als 40, können die unbekannten Varianzen σ_1^2, σ_2^2 nicht verlässlich durch s_1^2 bzw. s_2^2 geschätzt werden. Um deswegen den t-Test anwenden zu können, muß die Varianzhomogenität getestet werden.

Hypothese: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$

Testniveau: $\alpha = 0,01$

Gegenhypothese: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$

Testgröße: $\frac{s_1^2}{s_2^2}$

Kritischer Bereich: $\frac{s_1^2}{s_2^2} > F_{n_1-1, n_2-1, 1-\alpha}$

wobei $F_{n_1-1, n_2-1, 1-\alpha}$ die Grenze der F-Verteilung mit n_1-1, n_2-2 Freiheitsgraden und der Wahrscheinlichkeit $1-\alpha$ ist.

$$\frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{291,398}{209,293} = 1,392 \quad 1,392 \leq 2,41$$

$$F_{29,29, 0,99} \approx 2,41$$

daraus folgt: Die Testgröße liegt nicht im kritischen Bereich, d.h., die Hypothese $\sigma_A^2 = \sigma_U^2$ kann nicht verworfen werden.

t-Test :

Hypothese: Der Anteil Y-tragender Spermien bei abstinenten Versuchspersonen ist nicht signifikant verschieden vom Anteil der nicht-abstinenten Versuchspersonen.

Gegenhypothese: Abstinenz beeinflusst den Anteil Y-tragender Spermien.

Testverfahren: Es kann der t-Test angewandt werden, da Varianzhomogenität angenommen werden kann.

Dementsprechend muß das gemeinsame $\sigma^2 = \sigma_A^2 = \sigma_U^2$ durch folgende Schätzfunktion geschätzt werden:

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}, \text{ wobei}$$

$$s_1^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{1i} - \bar{x}_1)^2}{n_1 - 1} \quad \text{und} \quad s_2^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_2} (x_{2i} - \bar{x}_2)^2}{n_2 - 1}$$

Die Testgröße ist $\bar{x}_2 - \bar{x}_1$

Der Annahmebereich:

$$-t \cdot \sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} \leq \bar{x}_2 - \bar{x}_1 \leq t \cdot \sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

$n_1 + n_2 - 2; 1 - \frac{\alpha}{2}$ $n_1 + n_2 - 2; 1 - \frac{\alpha}{2}$,

wobei $t_{n_1 + n_2 - 2}$ 0,995 die Grenze der t-Verteilung bei 99,5 % Sicherheit und $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden ist.

$$s^2 = \frac{29 s_1^2 + 29 s_2^2}{58} = \frac{29 \cdot 291,398 + 29 \cdot 209,293}{58} = 250,346$$

=====

$$\sqrt{s^2 \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} = \sqrt{250,346 \frac{1}{30} + \frac{1}{30}} = 4,085$$

$$t_{58, 0,995} \approx 2,660$$

Der Annahmebereich ist daher:

$$- 2,66 \cdot 4,085 \leq \bar{x}_2 - \bar{x}_1 \leq 2,66 \cdot 4,085$$

$$- 10,866 \leq \bar{x}_2 - \bar{x}_1 \leq 10,866$$

Da $\bar{x}_2 - \bar{x}_1 = 5,7$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Meßreihen.

Tabelle II gibt eine Aufgliederung von Tabelle I.

Es wird hier darauf Wert gelegt, die Ejakulate in der Reihenfolge, in der sie während des gesamten Versuchs ausgezählt wurden, darzustellen.

Tabelle II

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an Y-tragenden Spermien an, der für jedes Präparat einmal ausgezählt wurde.
Färbezeit : 15 Min.

Patienten mit Fertilitätsstörungen (mit Karenz) in % :	Unausgewählte Spender (ohne Karenz) in % :
35	44
61	55
51	40
$\bar{x} = 53,4$	55
56	58
53	39
55	33
59	55
48	62
52	$\bar{x} = 46,9$
<u>1. Versuch</u>	52
64	61
36	30
42	34
33	46
44	35
$\bar{x} = 37$	54
45	42
31	45
36	40
39	58
33	<u>1. Versuch</u>
<u>2. Versuch</u>	31
6	22
6	10
8	58
10	38
$\bar{x} = 16,6$	56
12	34
16	12
21	16
27	14
30	43
<u>3. Versuch</u>	30
	<u>2. Versuch</u>

Tabelle III gibt eine Zusammenstellung von Ejakulaten, die bei unterschiedlicher Färbedauer (15 bzw. 30 Min.) angefärbt wurden.

Gruppe I enthält 10 Personen mit Fertilitätsstörungen, Gruppe II 5 unausgewählte Spender ohne Abstinenz.

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an Y-tragenden Spermien an, der für jedes Präparat ausgezählt wurde.

Bei Gruppe I wurde zusätzlich ein doppelter Blindversuch durchgeführt, der die ausgezählten Werte bestätigte.

Tabelle III

<u>Gruppe I</u>		<u>Gruppe II</u>	
<u>15 Min.</u>	<u>30 Min.</u>	<u>15 Min.</u>	<u>30 Min.</u>
6 %	10 %	42 %	58 %
6	13	39	56
8	14	48	57
10	16	48	56
12	16	50	60
16	22		
21	23		
27	27		
30	41		
30	50		

Folgender Test soll klären, ob die Färbezeit einen Einfluß auf den Anteil Y-tragender Spermien hat.

Statistisch ausgewertet werden die Ergebnisse der Gruppe I.

Testverfahren: Verteilungsunabhängiger Vorzeichentest
für verbundene Stichproben mit metrischen Ausprägungen.
(PFANZAGEL, 1968)

Durchführung des Tests: Zu testen ist die Hypothese, daß die Färbezeit keinen Einfluß auf den Anteil Y-tragender Spermien hat, gegen die Alternative, daß der Anteil nach 30 Min. größer ist. (Testniveau $\alpha = 0,01$)

15 x_i	6	6	8	10	12	16	21	27	30	30
30 y_i	10	13	14	16	16	22	23	27	41	50
$x_i - y_i$ $= d_i$	-5	-7	-6	-6	-4	-6	-2	0	-9	-20

Differenzen d_i , die 0 sind, können zur Entscheidung des Problems nicht beitragen und können weggelassen werden. Dementsprechend verringert sich der Stichprobenumfang auf $n^* = 9$.

Die Anzahl der Vorzeichenkombinationen v_i beträgt
 $N = 2^{n^*} = 2^9 = 612$.

Die kritische Region besteht aus $\alpha \cdot N = 0,01 \cdot 612 \approx 6$ Werten.

Auf Grund der Alternative wird die kritische Region aus den kleinen Summen $U = \sum_{d_i > 0} d_i$ gebildet.

Bestimmung der kritischen Region:

d_i	20	9	7	6	6	6	5	4	2	$U(v_i)$
v_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
v_2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
v_3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
v_4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5
v_5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	6
v_6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	6
v_7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	6
v_8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	6

v_7 und v_8 müssen in die kritische Region aufgenommen werden, da $U(v_6) = U(v_7) = U(v_8)$

Falls eine dieser Anordnungen auftritt, soll die Hypothese mit der Wahrscheinlichkeit γ abgelehnt werden.

Für γ gilt:

$$\begin{aligned} \alpha &= 0,01 = W(\text{Ablehnung}) \\ &= W\left[(v_1 \vee \dots \vee v_5)\right] + \left[W(v_6 \vee v_7 \vee v_8)\right] \cdot \gamma \\ &= 5 \cdot \frac{1}{514} + 3 \cdot \frac{1}{514} \cdot \gamma \end{aligned}$$

$$\Rightarrow \gamma = \frac{0,01 - 5/514}{3/514} = 0,047$$

Die Gesamtwahrscheinlichkeiten der Ablehnung der Hypothese sind also beim Auftreten der Anordnung v_k :

$$\Phi(v_k) = \begin{cases} 1 & \text{falls } 1 \leq k \leq 5 \\ 0,047 & \text{falls } 6 \leq k \leq 9 \\ 0 & \text{falls } 9 \leq k \end{cases}$$

Bei unserem Versuch ergab sich $v_k = v_1$, d.h. die Hypothese muß mit der Wahrscheinlichkeit 1 abgelehnt werden. Demnach hat die Färbezeit auf Grund unseres Versuches einen Einfluß auf den Anteil Y-tragender Spermien: Nach 30 Minuten erhöht sich der Anteil (siehe Säulendiagramm Abb. I).

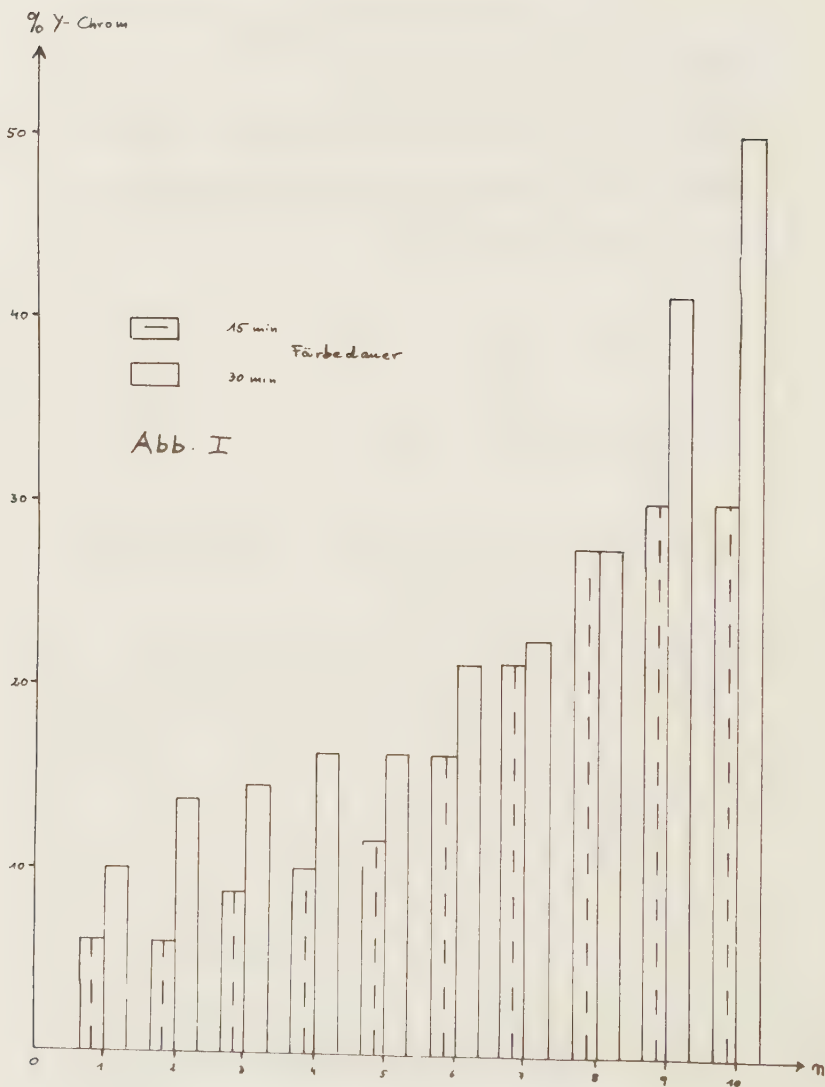


Abb. I

Abb. II :

Ergebnisse von 5 Versuchspersonen (ohne Karenzzeit), von denen auf Löschpapier Spuren von Androspermien angelegt wurden:

Die Präparate wurden in der ersten Woche alle 2 Tage untersucht. Darauf in Abständen von einer Woche über die Gesamtdauer von 2 Monaten.

In der ersten Woche konnte man nur unbedeutend viel weniger Spermien mit "F-Bodies" identifizieren. Eine Abnahme der Fluoreszenz-Intensität war nicht festzustellen. Nach einem Monat waren nur noch 50 % der am Anfang zählbaren "F-Bodies" nachweisbar.

Nach 2 Monaten wird die Fluoreszenz so schwach, daß man nur noch vereinzelt Zellen erkennen konnte. Man sah eine starke Deformierung, die Zellstruktur veränderte sich, die Zellen flockten aus und zerfielen in Bruchstücke.

Die Abnahme der Fluoreszenz wird hier graphisch dargestellt:

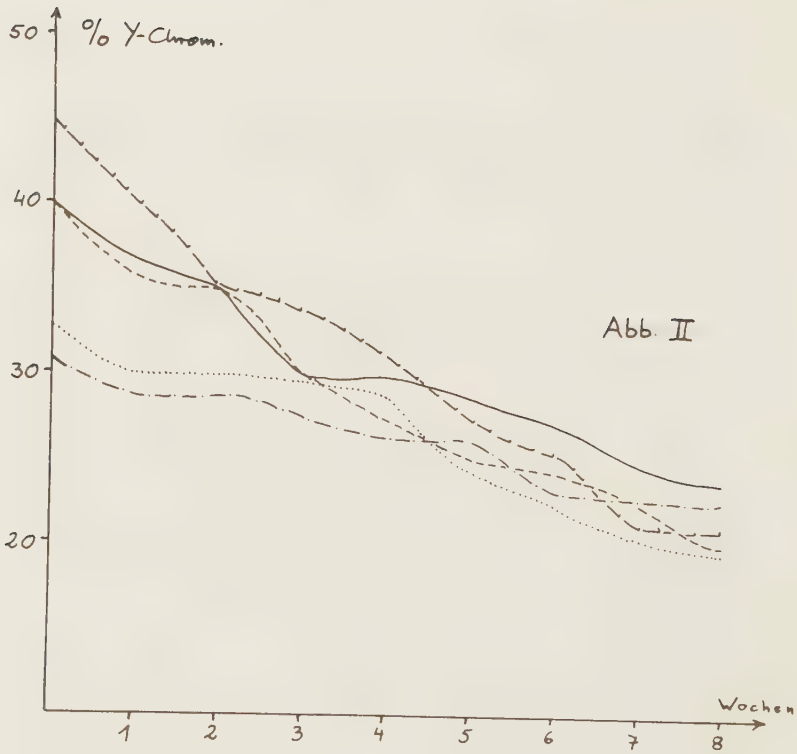


Abb. II zeigt die Abnahme der Fluoreszenz nach 2 Monaten bei fünf Versuchspersonen.

D. DISKUSSION

Die Hypothese, daß sich nach Abstinenz der Anteil an Y-tragenden Spermien erhöht, stützt sich auf folgende Beobachtungen: Die Bevölkerungsstatistik zeigt uns in der Sexualproportion der Geborenen, daß stets mehr Knaben als Mädchen zur Welt kommen. Auffallend ist auch die hohe Zahl männlicher Nachkommen in Kriegszeiten, besonders während des Zweiten Weltkrieges.

Nach Untersuchungen an Androspermien auf morphologischer Basis hat SHETTLES (1960, 1961 und 1970) folgende Theorien entwickelt: Spermien mit Y-Chromosomen haben einen runden, relativ kleinen Kopf, X-Chromosomen-tragende Spermien demgegenüber einen ovalen, relativ großen Kopf. Die meisten Männer besitzen den kleinen runden Spermientyp. Im Ejakulat soll ein Verhältnis von 2:1 zu Gunsten der Y-tragenden Spermien bestehen.

Er vertritt weiterhin die Ansicht, daß mit zunehmender Karenzzeit die Anzahl der Androspermien größer wird. Auf Grund unserer Ergebnisse (siehe Tabelle I) kann diese Ansicht nicht bestätigt werden. Zwischen Karenzzeiten von maximal 2 Tagen und einer Woche bestehen keine eindeutigen Unterschiede. (siehe t-Test)

Wie bereits erwähnt, ist auf Grund der meiotischen Reduktionsteilung ein Wert von 50 % Y-Chromosom-positiver Spermien zu erwarten. Ein solcher Wert wird bei unseren Ergebnissen aber nur selten beobachtet.

Tabelle II zeigt, daß bei den ersten Versuchen ein relativ hoher Anteil an Androspermien gefunden wurde (siehe Mittelwerte), der sich bei den weiteren Versuchen stark verringerte. Auf Grund dieser unterschiedlichen Werte muß eine objektive Auszählung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in Frage gestellt werden. Dabei kann die Position des F-Body, eine Überlagerung durch Plasma, Bakterien und Leukozyten, oder der Kondensierungszustand des Chromatins eine Rolle spielen. (KAISER, 1974) Die gefundenen Mittelwerte von 35,7 % bei Personen mit Karenz, bzw. 41,4 % bei Personen ohne Karenz widerlegen zwar die Hypothese über den Einfluß von Abstinenz, stimmen jedoch gut mit den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen folgender Autoren überein:

BARLOW und VOSA (1970) berichten, daß beinahe die Hälfte ihrer mit Quinacrin-Mustard angefärbten Spermatozoen ein F-Body besitzen, der Anteil verringert sich jedoch bei Färbung mit Atebrin. G. MOSCETTI et al. (1972) untersuchte bei 2850 Spermien das Y-Heterochromatin nach einer Fluoreszenzfärbung mit Acranyl.

Er konnte in 44 % der Fälle ein F-Body nachweisen. Die Arbeiten von J. KEGEL et al. (1972) mit Atebrin ergeben folgende Befunde: 45 % der Spermien zeigten F-Spots. W. RODHE et al. (1972) färbten ihre Ejakulate mit Atebrin und unterzogen sie dann einer milden Trypsinierung. Es fand sich ein hoher Durchschnittswert von 65 %. A. KIM, L. BIER und F. MAJEWSKI (1971) fanden heraus, daß sich bei der Fluochromierung menschlicher Chromosomen durch Atebrin-Essigsäure die gleichen Ergebnisse erzielen lassen wie mit Quinacrin-Mustard. Der Unterschied beruht lediglich auf der Substitution eines H-Atoms durch Cl in den beiden Äthylgruppen der Seitenkette. Bestätigt werden unsere Ergebnisse ebenfalls durch die Arbeiten von A.T. SUMNER et al. (1971) und I.H. PAWLOWITZKI und P.L. PEARSON (1972). SUMNER fand in diesem Zusammenhang 41,6 % Y-tragender Spermien als Durchschnittswert, PAWLOWITZKI-43,9 %. Beide verwendeten Atebrin, bzw. Atebrin-Essigsäure.

Während die Färbezeit mit Atebrin von allen Autoren mit 5 Minuten angegeben wurde, wurde für die Färbezeit mit Quinacrin-Mustard eine Dauer von 20 Minuten beschrieben. (BARLOW, VOSA, CASPERSSON). R. KAISER (1973) färbte seine Ejakulate 40 Minuten mit Q.M.. (Er fand dabei einen Mittelwert von 46,2 %). Die Tatsache, daß sich bei längerer Färbezeit mehr F-Bodies pro Präparat auszählen lassen, zeigt Tabelle III

unserer Ergebnisse. Die Werte sind nach 30 Minuten signifikant höher. Demnach dürfte die Färbedauer einen Einfluß auf den Anteil Y-tragender Spermien haben. Die Präparate sollten also mindestens 30 Min. mit Q.M. gefärbt werden.

Bei dem Anlegen von Spuren gewonnener Ejakulate hat sich Quinacrin-Mustard ebenfalls bewährt. Die Abnahme der am Anfang sichtbaren Zellen um 50 % nach 8 Wochen hat hauptsächlich folgenden Grund: Allmähliche Autolyse dieser Zellen. Zwar zeigen die Spermien im Bereich des Chromatins noch eine deutliche Fluoreszenz, der auffallend helle Punkt ist jedoch seltener sichtbar. Nach 2 Monaten ist eine exakte Auszählung schwer möglich, einzelne Zellen kann man jedoch noch unverkennbar als Androspermien identifizieren. Damit bietet sich die Möglichkeit, Material (Stoff, etc.) nach einer Dauer von maximal 2 Monaten auf das Vorhandensein von Spermien zu prüfen.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Androspermien nach einer Fluoreszenzfärbung. Ejakulate von 60 Männern mit und ohne Fertilitätsstörungen bzw. Karenzzeit werden mit einer 0,01 %igen wässrigen Quinacrin-Mustard-Lösung gefärbt, mit dem Ziel, einen möglichen Einfluß von Abstinenz bzw. Färbezeit aufzuzeigen. Bei den beiden Meßreihen mit und ohne Karenz zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Die gefundenen Mittelwerte betragen 35,7 % bzw. 41,4 %. Nach einer Färbezeit von 30 Minuten erhöht sich der Anteil an Y-tragenden Spermien gegenüber einer Färbezeit von 15 Min. Weiterhin wird die Abnahme der Fluoreszenz von Spermien beobachtet, die 2 Monate auf Löschpapier getrocknet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BARLOW,P., VOSS,C.G.: The Y-Chromosom in human spermatozoa. Nature 226, 961-962 (1970)
2. CASPERSSON,T., ZECH,L., JOHANNSSON,C., MODEST,E.J.: Chromosoma (Berlin) 30, 215 (1970)
3. CASPERSSON,T., ZECH,L., JOHANNSSON,C., MODEST,E.J.: Fluorescent staining of heteropyknotic chromosome regions in human interphase nuclei. Exp. Cell. Res. 61, 472-474 (1970)
4. CASPERSSON,T., ZECH,L., JOHANNSSON,C.: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp. Cell. Res. 60, 315 (1970)
5. KAISER,R., BROER,K.H., CITOLER,P., LEISTER,B. : Nachweis Y-Chromatin-positiver Spermien im Zervixsekret beim In-vitro-Penetrationstest. Geburtsh. u. Frauenheilk. 34, 426-430 (1974)
6. KEGEL,J., CONEN,P.E. : Nuclear Sex Identifikation in Human Tissues. A.J.C.P.- Vol. 57, (1972)
7. KIM,A., BIER,L., MAJEWSKI,F., PFEIFFER,R.A.: Fluorochromierung menschlicher Chromosomen mit Atebrin-Essigsäure. Humangenetik 12, 257-260 (1971)

8. KIM,A., BIER,L. : Indetification and Localisation of the Y-Body in interphase by Quinacrine and Giemsa. Humangenetik 16, 261-265 (1972)
9. MAJEWSKI,F., BIER,L., PFEIFFER,R.A. : Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des menschlichen Y-Chromosoms im Interphasenkern durch Akridinderivate. Klin. Wschr. 49, 814 (1971)
10. MOSCETTI,G., MASTROIANNI,F. : Fluorescent staining of the male chromatin body in interphase of human nuclei. Acta Genet. med. (Roma) 3, 256-259 (1971)
11. MOSCETTI,G. : Observations in Human Spermatozoa by Fluorescent "Acranil" Staining. Humangenetik 17, 75-77 (1972)
12. PAWLOWITZKI,I.H., PEARSON,P.L. : Chromosomal Aneuploidy in Human Spermatozoa. Humangenetik 16, 119-122 (1972)
13. PEARSON,P.L., BOBROW,M., VOSA,C.G. : Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. Nature 226, 78-80 (1970)
14. PFANZAGEL,B. : Allgemeine Methodenlehre der Statistik II. Berlin (1968)

15. ROHDE, W., PORSTMANN, T., ZILLMANN, R., DÖRNER, G.:
Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des
Y-Chromosoms in unbehandelten und trypsinbehan-
delten menschlichen Spermien.
Acta. biol. med. germ., Band 28, 189-192 (1972)
16. SHETTLES, L.B. : X- and Y-Spermatozoa. Nature 187,
253 (1960)
17. SHETTLES, L.B. : Human spermatozoan shapes in
relation to sex ratios. Fertil. and Steril.
12, 502 (1961)
18. SHETTLES, L.B. : Factors influencing sex ratios.
Int. J. Gynec. Obstet. 8, 645 (1970)
19. SUMNER, A.T., ROBINSON, J.A., EVANS, H.J. :
Distinguishing between X, Y and XY bearing human
spermatozoa by fluoreszenz and DNA content.
Nature, New. Biol. 229, 231 (1971)

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Spann
und Herrn Professor Dr. Liebhardt für die Überlassung des
Themas, Herrn Doktor Tröger für seine fachlichen Ratschläge,
und Fräulein Schmidt für ihre stets freundliche Hilfe im
cytologischen Labor.

Herrn Jürgen Ahmerkamp , Student der Mathematik, gilt mein
besonderer Dank für seine Hilfe bei der statistischen
Ausarbeitung.

L E B E N S L A U F

Am 5. Juli 1946 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Klaus Henkel und seiner Ehefrau Vera, geb. Cammisar in München geboren.

Von 1952 - 1956 besuchte ich die ev. Volksschule in Partenkirchen und setzte meine Schulausbildung von 1956 - 1966 am humanistischen Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen fort. Hier legte ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ab.

Vom 1. Okt. 1966 - 1968 diente ich bei der Bundeswehr in Mittenwald im Hochgebirgszug.

Im Wintersemester 1968/69 studierte ich ein Semester Betriebswirtschaft an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Sommersemester 69 wechselte ich an die Medizinische Fakultät derselben Hochschule. Im Winter 1972 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und beende mein Studium im Sommer 1975 mit dem Staatsexamen.

